

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12Q 1/68

C12Q 1/04 C12P 19/34



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03116659.8

[43] 公开日 2003 年 10 月 22 日

[11] 公开号 CN 1450172A

[22] 申请日 2003.4.26 [21] 申请号 03116659.8
[71] 申请人 杭州华大基因研发中心
地址 310007 浙江省杭州市西湖区西山路 13 号
[72] 发明人 汪建 王俊 李蔚 徐祖元
林伟 胡咏武 张晓伟 邓亚军
杨唤明

[74] 专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公司
代理人 韩介梅

权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图 1 页

[54] 发明名称 检测非典型性肺炎病毒的方法及其试剂盒

[57] 摘要

本发明公开了一种临床检测非典型性肺炎病毒的方法及其试剂盒。根据非典型性肺炎病毒基因组序列的特征分析,选取特异性的区域,又根据该病毒是核糖核酸病毒的特点,利用特定的引物序列,采用 RT-PCR 和 PCR 相关的试剂与技术,建立了一套快速检测非典型性肺炎病毒的方法。本发明的有益效果是解决了临床对非典型性肺炎病毒感染者的早期快速诊断问题,具有较高的准确性,为临床检测本病提供了快速、准确的诊断方法和试剂盒。

BEST AVAILABLE COPY

ISSN 1000-4274

知识产权出版社出版

1. 一种检测非典型性肺炎病毒的方法，它包括以下几个步骤：
 - 1) 取可疑病人的血清、分泌物或组织等生物学样本，提取 RNA。
 - 2) 加入反向引物和逆转录酶，合成 cDNA。
 - 3) 加入正向引物，利用聚合酶链式反应 (PCR) 技术扩增非典型性肺炎病毒的基因组核酸序列。
 - 4) 采用常规实验室检测 DNA 技术检测结果。
2. 按权利要求 1 所述的检测非典型性肺炎病毒方法，其特征在于所说的 PCR 反应扩增的非典型性肺炎病毒的基因组核酸序列具有序列 Seq. ID No.1、Seq. ID No.2、Seq. ID No.3、Seq. ID No.4、Seq. ID No.5、Seq. ID No.6 所示的核酸序列。
3. 按权利要求 1 所述的检测非典型性肺炎病毒方法，其特征在于加入的正、反向引物具有如表 1 的核酸序列，表中 L 为正向引物，R 为反向引物。
4. 按权利要求 1 所述的检测非典型性肺炎病毒方法的试剂盒，其特征在于它包括以下试剂：PBS 缓冲液、溶液 D (溶液 D 含：2.5 克异硫氰酸胍、1.76 毫升 0.75M 的柠檬酸钠 (PH7.0)、2.46 毫升 10% 的十二烷基肌酸钠，加水 29.3 毫升，使用前加入 7.2 μ l/ml 的巯基乙醇)、酚、氯仿和 4.0M (PH=3.8) 醋酸钠、RT 缓冲液 dNTP、引物和使用说明书。

检测非典型性肺炎病毒的方法及其试剂盒

技术领域

本发明涉及检测非典型性肺炎病毒的方法及其试剂盒。

背景技术

非典型性肺炎病毒，即 SARS 病毒是一种引起严重急性呼吸道疾病综合症（Severe Acute Respiratory Syndrome，SARS），又称非典型性肺炎的病毒，属冠状病毒（coronavirus）类病毒，基因组共含 29,737 个核苷酸。该病主要通过近距离空气飞沫和密切接触传播。该病毒目前还没有有效的免疫化学检测方法，只能根据临床症状（高热、干咳、肺部 X 光检测有阴影等）来诊断，受到很大的局限，只能在受感染者发病后才能作出诊断，且不易与其它肺炎和一般流感区别。

发明内容

本发明的目的是提供一种检测非典型性肺炎病毒的方法及其试剂盒。

发明提供的检测非典型性肺炎病毒的方法，它包括以下几个步骤：

1) 取可疑病人的血清、分泌物或组织等生物学样本，提取 RNA；

提取 RNA 的方法可采用普通分子生物学实验手册，如“分子克隆”介绍的方法，也可以采用商业试剂盒，如 Trizol[®]，按说明书进行。

2) 加入反向引物和逆转录酶，合成 cDNA；

加入的反向引物为根据非典型性肺炎病毒特异核酸序列和 PCR 反应要求所设计，“非典型性肺炎病毒特异核酸序列”具有 Seq. ID No.1、Seq. ID No.2、Seq. ID No.3、Seq. ID No.4、Seq. ID No.5、Seq. ID No.6 所示的核酸序列；

发明中采用的引物序列，为表 1 所示的核酸序列，表 1 中 R 为反向引物；采用商品化试剂盒，如 Invitrogen[™] 公司的 SuperScript 试剂盒，按说明书步骤合成 cDNA。

3) 加入正向引物，利用聚合酶链式反应（PCR）技术扩增非典型性肺炎病毒的基因组核酸序列；

加入的正向引物为根据非典型性肺炎病毒特异核酸序列和 PCR 反应要求所设计，“非典型性肺炎病毒特异核酸序列”为具有 Seq. ID No.1、Seq. ID No.2、Seq. ID No.3、Seq. ID No.4、Seq. ID No.5、Seq. ID No.6 所示的核酸序列；

发明中采用的引物序列，为表 1 所示的核酸序列，表 1 中 L 为正向引物；

本发明中, PCR 反应体系的组成为一般的标准组成, 包括: PCR 反应缓冲液 (Tris.Cl 125mM PH 8.1; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 125mM; MgCl_2 12.5mM; BSA 1mg/ml; Formamide 25%); 反应条件指: 模板变性温度为 92°C - 98°C , 优选: 95°C , 时间为 10 秒-10 分钟, 优选: 30 秒; 模板退火温度为 45°C - 65°C , 优选: 52°C , 时间为 10 秒-10 分钟, 优选: 30 秒; 模板延伸温度为 65°C - 85°C , 优选: 70°C , 时间为 10 秒-10 分钟, 优选: 40 秒; 循环 20-40 次, 优选: 30 次。

4) 采用常规实验室检测 DNA 技术检测结果;

常规实验室检测 DNA 技术检测, 如采用 1% 琼脂糖电泳检测: 用溴乙锭染色, 在紫外光下观察, 有条带的为阳性, 无条带的为阴性; 也可采用荧光 PCR 法检测以提高检测灵敏度, 其方法均可在常规实验室手册查到。

本发明的用于检测非典型性肺炎病毒的试剂盒, 它包括以下试剂: PBS 缓冲液、溶液 D (溶液 D 含: 2.5 克异硫氰酸胍、1.76 毫升 0.75M 的柠檬酸钠 (PH7.0)、2.46 毫升 10% 的十二烷基肌酸钠, 加水 29.3 毫升, 使用前加入 $7.2\mu\text{l/ml}$ 的巯基乙醇)、酚、氯仿和 4.0M (PH=3.8) 醋酸钠、RT 缓冲液 dNTP、引物和使用说明书。

本发明根据非典型性肺炎病毒的基因组序列分析结果, 选取该病毒特有的核酸序列区, 设计引物, 并针对该病毒是一种核糖核酸病毒 (RNA 病毒) 的特点, 为临床检测非典型性肺炎病毒提供了快速、准确的诊断方法和试剂盒。采用该方法能快速地对可疑感染者进行基因检测, 解决了临床对非典型性肺炎病毒感染者的早期快速诊断问题。

附图说明

图 1 是琼脂糖电泳检测的结果, 从左至右 1-5 为阳性结果, 7-8 为阴性对照, 10 为分子量标记。

具体实施方式

实施例

1、取可疑病人的生物学样本, 提取 RNA:

1) 取可疑病人的血清、分泌物或组织, 加入 PBS 缓冲液 $50\mu\text{l}$ 、溶液 D $160\mu\text{l}$ 、酚 $160\mu\text{l}$ 、氯仿 $32\mu\text{l}$ 和 4.0M (PH=3.8) 醋酸钠 $9\mu\text{l}$ 。

溶液 D 含: 2.5 克异硫氰酸胍、1.76 毫升 0.75M 的柠檬酸钠 (PH7.0)、2.46 毫升 10% 的十二烷基肌酸钠, 加水 29.3 毫升, 使用前加入 $7.2\mu\text{l/ml}$ 的巯基乙醇。

2) 振荡混合液 15 秒, 冰上放置 15 分钟。

3) 14000rpm , 4°C 离心 20 分钟。

4) 取上清, 加入等体积的异丙醇, 冰上放置 25 分钟。

5) 4°C, 14000rpm 离心 20-30 分钟。

6) 沉淀用 -20°C 预冷的乙醇洗两次, 真空抽干, 溶于 DEPC 水中。

2、加入反向引物和逆转录酶, 合成 cDNA;

采用 Invitrogen™ 公司的 SuperScript 试剂盒

1) 适量样品 RNA、加入表 1 中所列的反向引物 (0.5ug/ml) 2.5 μl, 95 °C 保温 3-4 分钟, 冰上冷却。

2) 加入 5×RT 缓冲液 4.0 μl、dNTP¹ (10mM) 1.0 μl、0.1M DTT 2.0 μl、Superscript (200u/μl) 1.0 μl、Rnasein (25u) 1.0 μl, 40°C 保温 1 小时, 70°C 保温 5 分钟, 冰上冷却。

3、加入正向引物, 利用聚合酶链式反应 (PCR) 技术扩增非典型性肺炎病毒的基因组核酸序列;

取步骤 2 合成的 cDNA 模板 1.0 μl、加入表 1 中所列的正向引物 1.0 μl、10×PCR 反应缓冲液 2.5 μl、Mg²⁺ (25mM) 1.75 μl、dNTP (2.5mM) 0.8 μl、Taq (5u/μl) 0.25 μl, 加水至 25 μl; 95°C 保温 5 分钟。95°C, 30 秒; 54°C, 45 秒; 72, 1 分钟, 循环 30 次, 72°C 保温 7 分钟。

4、结果检测

1%琼脂糖电泳检测, 用溴乙锭染色, 紫外光下观察, 有条带的为阳性, 无条带的为阴性。

表 1 用于检测的引物序列

引物名称	引物序列	基因组位置
p00001.1.L	ACGAACTTTAAAATCTGTGTAGC	51
p00001.59.L	ATGCCTTAAGCACCAATCAC	472
p00001.1.R	ATTTCTGCAACCAGCTCAAC	504
p00001.70.L	CAAGTCAATGTGCACTCTTTC	875
p00001.59.R	CTCTTCGACTCGATGTAATCA	905
p00001.7.L	TGTGGCACTGAAAATTTAGTTA	1278
p00001.70.R	TAGGTACCCACATGTAGTAGGTC	1306
p00001.18.L	GGCATCTTTCTCTGCTTCTAC	1679
p00001.7.R	GGTTTTGAAAGACTTGTAATCAA	1729
p00001.29.L	CTCAGTGGTTGTCTAATCTTTTG	2077
p00001.18.R	CTGAGTTTTTCAACAGTAGTGC	2101
p00001.40.L	AGGTGATTACATGACACAGTA	2477
p00001.29.R	GAACAACCTCCTCAGAGGTAA	2500
p00001.51.L	AGAGGCTGTTGTGAAGACTTT	2879

p00001.40.R	AGGAGATCAGAACTGGTTGT	2900
p00001.57.L	TGGTTATTTAAACTTACTGACAAT	3269
p00001.51.R	CCTTAACGATGTCAACACATTT	3303
p00001.58.L	AACCACTTCAGTCTTACAAGTG	3652
p00001.57.R	GCTTTGTCACTGACTGCAATA	3704
p00001.60.L	TGTTGTAATACCCTCCAAAAAG	4070
p00001.58.R	TCITGAGAGCATCTCAGTAGT	4101
p00001.61.L	TTATTACGAAGCTGAACTCTCTA	4477
p00001.60.R	ATTGTGACAAGCGGCTCATT	4500
p00001.62.L	GACTATAAAAGTGTTCACAACTG	4877
p00001.61.R	GTGTGTGGAGATTAGTGTGTC	4902
p00001.63.L	TATTATAGAGCCCGTGCTGGT	5274
p00001.62.R	AGTATGAGTGCACAAAAGTTAGC	5301
p00001.64.L	TCAGTGTGGTCATTACACTCATA	5672
p00001.63.R	AATACGATAGAGGGTCTCCTTAG	5701
p00001.65.L	GCGATGTAGTGGCTATTGAC	6073
p00001.64.R	TTCTTGAAACTCGCTGAATAGT	6100
p00001.66.L	GGAAAACACAAGCATTACCAT	6479
p00001.65.R	CCTAAGGCTAGTGAAAGCTCAT	6511
p00001.67.L	TGGCTATTGTTGTTAAGTATTTG	6873
p00001.66.R	GCAGTTACACAGATTAGAGAACC	6900
p00001.68.L	GCTCATGTGGTTTATCATTAGTA	7268
p00001.67.R	TACATCCTAACCATTGCAGAA	7310
p00001.69.L	CGCTTCACCTCTACTTTGAC	7678
p00001.68.R	CTCTCATAGGTCTTTTGACCAG	7702
p00001.71.L	TCCTTTCTACATTTCGTGTCAAG	8065
p00001.69.R	GTCAACATCGGTATCAACAAC	8100
p00001.72.L	TGTTAGTACTTGTTTTAACTTATGC	8474
p00001.71.R	CGCACAATAATGTGGCCTTA	8501
p00001.73.L	CTACACACCTTCCAAACTCATT	8867
p00001.72.R	AAGAACGCAAGCAGAGGTAG	8905
p00001.74.L	TACTCCTCTTGTCGAACCTG	9272
p00001.73.R	CACTACTGAAGCAGACACATCTA	9301
p00001.75.L	CATGTTTAATGGAGTTACATTTAGT	9674
p00001.74.R	TTGTTGAGCAAAAAGGTACAC	9719
p00001.2.L	TGTGGTTGGATGACACAGTAT	10057
p00001.75.R	TAAGCATGTCTTCTGCTGTG	10100
p00001.3.L	GAGTACACGCTGGTACTGACTTA	10477
p00001.2.R	AAATGGACCATAGAATTTACCTT	10501
p00001.4.L	ACCTTCCAAGGTAAGTTCAAG	10878
p00001.3.R	GATGAGTGCCCTTAACAATT	10900
p00001.5.L	GTTTATGATGATGCTGCTAGAC	11277
p00001.4.R	GACATTCATCAGTGTCCAAAC	11301

p00001.6.L	CCTAAGAGTAGTATTGATGCTTTC	11670
p00001.5.R	CTCCAATACCCAACAACCTTAAT	11703
p00001.8.L	GCTGTAGCTAATGGTGATTCTG	12078
p00001.6.R	CTTTAACTTTTTGAGAACGACTT	12100
p00001.9.L	CAAGTTGTTGATGCGGATAG	12477
p00001.8.R	TTAATTTCACTAAGTTGAACAATC	12500
p00001.10.L	CAAAGGCTTAAACAACCTAAATA	12872
p00001.9.R	CCTGAAGACGTA CTGTAGCA	12920
p00001.11.L	CACTTAGAAACA CAGTCTGTACC	13270
p00001.10.R	AGCCATAACCTTTCCACATT	13301
p00001.12.L	GTGACATGGTACCACATATATCA	13677
p00001.11.R	CAGCCATTGTGTATTTAGTTAGA	13708
p00001.13.L	GCCCATCCTCACTTTGACTA	14080
p00001.12.R	AGCATCCATATGGGACTCAG	14112
p00001.14.L	TATGCTGCTGATCCAGCTAT	14474
p00001.13.R	TAGCAATAAATTGCCAGAAG	14502
p00001.15.L	TAATAAATGGGGTAAGGCTAGA	14872
p00001.14.R	ATCTTGATCCTCATAACTCATTG	14907
p00001.16.L	CAAACATAACACTTGCTGTAACCT	15274
p00001.15.R	CTAACCTGTAGAAACGGTGTG	15300
p00001.17.L	GTTTAGTAGCTAGCATTAAAGAACT	15675
p00001.16.R	CAGACATGAACACATTATTTTGA	15718
p00001.19.L	TGCTAACTAATGATAACACCTCAC	16071
p00001.17.R	ATAGCCTCATAAACTCAGGTTC	16103
p00001.20.L	ATAGCAACATGTGATTGGACTAA	16475
p00001.19.R	ACAAGTGTGGCAAGTATGTAAT	16506
p00001.21.L	CAAGAGCACTATGTGAGAATTAC	16877
p00001.20.R	ATGTTGAGTGTTGGGTACAAG	16903
p00001.22.L	TTGATGAAATCTCTATGGCTACT	17268
p00001.21.R	GTCTAGCATTGACAACACTCAA	17300
p00001.23.L	AAAAGCTGTTTTATCTCACCTT	17671
p00001.22.R	TGAAGCTACAGCGTTCTGTG	17700
p00001.24.L	ACATACCAGGCATACCAAAG	18075
p00001.23.R	CATAGAGATGAGTCTACGGTAGGT	18101
p00001.25.L	GGATTGTCAGACAGAGTCGT	18479
p00001.24.R	TCTTGACAAAGTACTTCATTGAT	18532
p00001.26.L	CTTGACAGAAAAGTACAACACAT	18876
p00001.25.R	AAGCAATGCAGACTTCACAA	18900
p00001.27.L	TTGCCTTTCTTTTACTATTCTGA	19277
p00001.26.R	CCATGAGACTCACAAGGACTA	19300
p00001.28.L	ACTTCCTGTTAATGTTGCATT	19678
p00001.27.R	CACTGGTTTAATGTTACGCTTAG	19710
p00001.30.L	GTAGACGGCATTATTCAACAGT	20078

p00001.28.R	GCTCTGAGTAAAGTAGGTTTCAG	20103
p00001.31.L	CAAAAGTGGTCAAGGTTACAAT	20478
p00001.30.R	CACCAAAGCATGAATGAAAT	20513
p00001.32.L	TCAGATCTTAATGACTTCGTCTC	20864
p00001.31.R	TGCACAGTCTCCAATTAAAGT	20900
p00001.33.L	ATCCTATCCAGTTGTCTTCCTAT	21276
p00001.32.R	ATTTGCTCATGTCAAAGAGTG	21300
p00001.34.L	TTCTAATGTACAGGGTTTCATA	21664
p00001.33.R	CATCCTTAAAAGGTATGACAGG	21710
p00001.35.L	GGCTATCAACCTATAGATGTAGTTC	22070
p00001.34.R	CAAAGTGTTAAAACCAGAAGGTA	22101
p00001.36.L	ACTAAATCCCTTCTGTCTATGC	22469
p00001.35.R	TAATCAGCAACACAATTAGAAAT	22508
p00001.37.L	CCCACCTGCTCTTAATTGTTA	22879
p00001.36.R	TGGTGTA AAAACCATAATCATTTA	22908
p00001.38.L	TAACTGCACTGATGTTTCTACA	23277
p00001.37.R	GAGTTGATCTGCATGAATTG	23301
p00001.39.L	CTTCTCCAATATGGTAGCTTTT	23678
p00001.38.R	GAGTGACGATTTAGTTGTGT	23702
p00001.41.L	CTGGATGGACATTTGGTGCT	24072
p00001.39.R	GCATAGCAAAAAGGTATTTGAAG	24101
p00001.42.L	ATCAGGGCTTCTGCTAATCT	24473
p00001.41.R	CAAGAACACACTCAGACATTTTA	24502
p00001.43.L	TGGACAAGTACTTCAAAAATCAT	24876
p00001.42.R	GTCGCCAAGATCAACATCTG	24906
p00001.44.L	TTTACTCTTGGATCAATTACTGC	25273
p00001.43.R	AGAAGCATTGTCAATTTTACTG	25301
p00001.45.L	TTATGATGCCAACTACTTTGTTT	25671
p00001.44.R	TGGTATACAGTAGTCATAGTTATGTG	25703
p00001.46.L	AGCACAAGAAAGTGAGTACGA	26076
p00001.45.R	TCCGAAACGAATGAGTACATA	26100
p00001.47.L	ATGTTACTACAATTTGCCTATTC	26475
p00001.46.R	TATTATGTACAAAAACCTGTTCC	26503
p00001.48.L	AAGAGATCACTGTGGCTACATC	26875
p00001.47.R	ACGCTCCTAATTTGTAATAAGA	26907
p00001.49.L	TCTCTTCCTGACATTGATTGTAI	27268
p00001.48.R	CTCTAACACACTCCTGATAGTGA	27310
p00001.50.L	TTTCTGCTATTCCCTGTTTAAAT	27667
p00001.49.R	ATTTCGAGTGAAAACCAAAATA	27701
p00001.52.L	GTTGTTTTAAATAAACGAACAAA	28076
p00001.50.R	GGGTCCATTATCAGACATTTTA	28100
p00001.53.L	GCTAACAAAGAAGGCATCTGTA	28479
p00001.52.R	GTATTCAAGGCTCCCTCAGT	28509

p00001.54.L	AGCCTCGCCAAAAACGTACT	28876
p00001.53.R	TTGAGTGACGTTGTACTGTTTT	28901
p00001.55.L	AAAGGACAAAAAGAAAAAGACTG	29213
p00001.56.L	AAAGGACAAAAAGAAAAAGACTG	29213
p00001.54.R	CTGGAGAAATCATCCATGTC	29301
p00001.55.R	AATTTTACACATTAGGGCTCTTC	29636
p00001.56.R	AATTTTACACATTAGGGCTCTTC	29636

核酸序列表:

<110>杭州华大基因研发中心*

<120>非典型性肺炎病毒的基因检测法及试剂盒

<160>6

<170>PatentIn Version 3.1

<210>1

<211>1953

<212>DNA

<213>coronavirus SARS

<400>1

```

ctaccagga aaagccaacc aacctcgatc tctttagat ctgttctcta aacgaacttt      60
aaaatctgtg tagctgtcgc tcggctgcat gcctagtgc cctacgcagt ataaacaata      120
ataaatitta ctgtcgttga caagaaacga gtaactcgtc cctcttctgc agactgctta      180
cggtttcgtc cgtgttgag tcgatcatca gcatacctag gtttcgtccg ggtgtgaccg      240
aaaggtaaaga tggagagcct tgttcttggt gtcaacgaga aaacacacgt ccaactcagt      300
tlgacctgcc ttcagggttag agacgtgcta gtgcglggct tcggggactc tgtggaagag      360
gccctatcgg aggcacgtga acacctcaaa aatggcactt gtggtctagt agagctggaa      420
aaaggcgtac tgccccagct tgaacagccc tatgtgttca ttaaactgtc tgatgcctta      480
agcaccaatc acggccacaa ggtcgttgag ctggttgag aaatggacgg cattcagtac      540
ggtcgttagcg gtataacact gggagtactc gtgccacatg tgggcgaaac cccaattgca      600
taccgcaatg ttcttcttcg taagaacggt aataaggag cgggtggtca lagctatggc      660
atcgatctaa agtcttatga cttaggtagc gagcttgga ctgatccat tgaagattat      720
gaacaaaact ggaacactaa gcatggcagt ggtgcacacc gtgaactcac tcgtgagctc      780
aatggaggtg cagtcaactg ctatgtcgac aacaatttct gtggcccaga tgggtaccct      840
cttgatigca tcaaagattt tctcgacgc gcgggcaagt caatgtgcac tctttccgaa      900
caacttgatt acatcgagtc gaagagaggt gtctactgct gccgtgacca tgagcatgaa      960
attgccctgg tcaactgagc ctctgataag agctacgagc accagacacc cttcgaaatt      1020
aagagtgcc aaaaatttga cactttcaaa ggggaatgcc caaagtgtgt gtttcctctt      1080
aactcaaaag tcaaagtcac tcaaccacgt gtigaaaaga aaaagactga gggtttcatg      1140
gggcgtatac gcctctgtga ccctgttgca tctccacagg agtgtaacaa tatgcacttg      1200
tctacctga tgaatgtaa lcaatgcgat gaagtctcat ggcagacgtg cgactttctg      1260
aaagccactt gtgaacattg tggcactgaa aatttagtta ttgaaggacc tactacatgt      1320
gggtacctac ctactaatgc tgtagtgaat atgccatgic ctgcctgtca agaccagag      1380
attggaccctg agcatagltg tgcagattat cacaaccact caaacattga aactcgactc      1440
cgcaaggaggt gtaggactag atgttttgga ggctgtgtgt ttgcctatgt tgctgtctat      1500

```

```

aataagcgtg cctactgggt tcctcgtgct agtgctgata ttggctcagg ccatactggc 1560
attactgggtg acaatgtgga gaccttgaat gaggatcicc ttgagatact gagtcgtgaa 1620
cgtgttaaca ttaacattgt tggcgatttt catttgaatg aagagggttg catcattttg 1680
gcatctttct ctgcttctac aagtgccttt attgacacta taaagagtct tgattacaag 1740
tctttcaaaa ccattgttga gtccctgcgtt aactataaag ttaccaaggg aaagcccgta 1800
aaaggtgctt ggaacattgg acaacagaga tcagttttta caccactgtg tggttttccc 1860
tcacaggctg ctggtgttat cagatcaatt tttgcgcgca cacttgatgc agcaaaccac 1920
tcaattcctg atttgcaaag agcagctgtc acc 1953

```

<210>2

<211>249

<212>DNA

<213>coronavirus SARS

<400>2

```

gatgaggaag aagaggacga tgcagagtgt gaggaagaag aaattgatga aacctgtgaa 60
catgagtacg gtacagagga tgattatcaa ggtctccctc tggaatttgg tgcctcagct 120
gaaacagttc gagttgagga agaagaagag gaagactggc tggatgatac tactgagcaa 180
tcagagattg agccagaacc agaacctaca cctgaagaac cagttaatca gtttactggt 240
tatttaaaa 249

```

<210>3

<211>732

<212>DNA

<213>coronavirus SARS

<400>3

```

ccagtigatg agtatataac cacgtaccct ggacaaggat gtgctggtta tacacttgag 60
gaagctaaga ctgctcttaa gaaatgcaaa tctgcatttt atgtactacc ttcagaagca 120
cctaagtcta aggaagagat tctaggaact gtatcctgga atttgagaga aatgcttgct 180
catgctgaag agacaagaaa attaatgcct atatgcatgg atgttagagc cataatggca 240
accatccaac gtaagtataa aggaattaaa attcaagagg gcatcgttga ctatggtgtc 300
cgattcttct ttatactag taaagagcct gtagcttcta ttattacgaa gctgaactct 360
ctaaalgagc cgttgttcac aatgccaat ggttatgtga cacatggttt taatcttgaa 420
gaggtcgcgc gcigtatgcg ttctcttaaa gctcccgccg tagtgtcagt atcatcacca 480
galgelgita ctacatafaa tggatacctc acttcgctat caaagacatc tgaggagcac 540
tttgtagaaa cagtttcttt ggctggctct tacagagatt ggtccctatc aggacagcgt 600
acagagtiag gtlgtgaatt tcttaagcgt ggtgacaaaa ttgtgtacca cactctggag 660
agccccgtcg aglttcatct tgacgggtgag gttctttcac ttgacaaact aaagagtctc 720
ttatccctgc gg 732

```

<210>4

<211>1177

<212>DNA

<213>coronavirus SARS

<400>4

```

ggtgtcaaat tacattacac ataaacgaac ttatggatit gtttatgaga ttttttactc 60
ttggatcaat tactgcacag ccagtaaaaa ttgacaatgc ttctcctgca agtactgttc 120
atgctacagc aacgataccg ctacaagcct cactcccttt cggaatggctt gttattggcg 180
ttgcatttct tgcgtttttt cagagcgcta ccaaaataat tgcgctcaat aaaagatggc 240
agctagccct ttataagggc ttccagtcca ttgcaattt actgctgcta tttgttacca 300
tctattcaca tcttttgctt gtcgctgcag gtatggaggc gcaatttttg tacctctatg 360
ccttgatata ttttctacaa tgcatacaac catgtagaat tattatgaga tgttggcttt 420
gttggaaagt caaatccaag aaccattac tttatgatgc caactactti gtttgcctggc 480
acacacataa ctatgactac tgtataccat ataacagtgt cacagatata attgtcgta 540
cigaaggatga cggcatttca acacaaaac tcaagaaga ctaccaaatt ggtggttatt 600
ctgaggatag gcactcaggt gttaaagact atgtcgttgt acatggctat ttcaccgaag 660
tttactacca gcttgagtct acacaaatta ctacagacac tggatttgaa aatgctacat 720
tcttcatctt taacaagctt gttaaagacc caccgaatgt gcaaatacac acaatcgacg 780
gctcttcagg agttgctaata ccagcaatgg atccaattta tgaatgagccg acgacgacta 840
ctagcgtgcc ttgtgaagca caagaaagt agtacgaact tatgtactca ttcgtttcgg 900
aagaaacagg tacgttaata gttaatagcg tacttctttt tcttgccttc gtggtattct 960
tgctagtcaac actagccatc cttactgcgc ttcgattgtg tgcgtactgc tgcaatattg 1020
ttaacgtgag tttagtaaaa ccaacggttt acgtctactc gcgtgttaaa aatctgaact 1080
cttctgaagg agttcctgat cttctggtct aaacgaacta actattatta ttattctgtt 1140
tggaacttta acattgctta tcatggcaga caacggt 1177

```

<210>5

<211>1059

<212>DNA

<213>coronavirus SARS

<400>5

```

cagtaagtga caacagatgt ttcactttgt tgacttccag gttacaatag cagagatatt 60
gattatcatt atgaggactt tcaggattgc tatttgaat cttagcgta taataagttc 120
aatagtgaaga caattattta agcctctaac taagaagaat tattcggagt tagatgatga 180
agaacctatg gagttagatt atccataaaa cgaacatgaa aattattctc ttcctgacat 240
lgattgtatt tacatcttgc gagctatata actatcagga gtgtgttaga ggtacgactg 300
tactactaaa agaaccttgc ccatcaggaa catacgaggg caattcacca ttaccctc 360
ttgctgacaa taaatttgca ctaacttgca ctacacaca ctttgccttt gcttgtgctg 420
acggtactcg acatacctat cagctgcgtg caagatcagt ttcacaaaa cttttcatca 480
gacaagagga ggttcaacaa gagctctact cgccactttt tctcattgtt gctgctctag 540
tatttttaat actttgcttc accatttaaga gaaagacaga atgaatgagc tcactttaat 600
tgacttctat ttgtgccttt tagcctttct gctattcctt gtttaataa tgccttatt 660
atlltgglll tcaactgaaa tccaggatct agaagaacct tgaacaaag tctaaacgaa 720
catgaacttt ctcaatgttt tgacttgtat ttctctatgc agttgcataat gcaactgtat 780
acagcgttgt gcatctaata aacctcalgt gcttgaagat ccttgaagg tacaacacta 840
gggttaatac ttatagcact gcttggcttt gtgctctagg aaagggttta ccttttcata 900
gatggcacac taiggttcaa acatgcacac ctaatgttac tatcaactgt caagatccag 960
ctgggtgtgc gcttalagct aggtgttgtt accttcatga aggtcaccaa actgctgcat 1020
ttagagacgt acttggllgt ttaataaac gaacaaatt 1059

```

<210>6

<211>255

<212>DNA

<213>coronavirus SARS

<400>6

agacaacttc	aaaattccat	gagtggagct	tctgctgatt	caactcaggc	ataaacactc	60
atgatgacca	cacaaggcag	atgggctatg	taaacgtttt	cgcaattccg	tttacgatac	120
atagtctact	cttgtgcaga	atgaattctc	gtaactaaac	agcacaagta	ggtttagtta	180
actttaatct	cacatagcaa	tctttaatca	atgtgtaaca	ttagggagga	cttgaaagag	240
ccaccacatt	ttcat					255

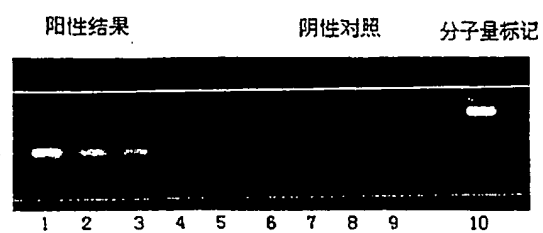


图 1

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.